



⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 30 557 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/564
G 01 N 33/533
G 01 N 33/68
C 07 K 14/435

②① Aktenzeichen: 196 30 557.8
②② Anmeldetag: 18. 7. 96
②③ Offenlegungstag: 29. 1. 98

DE 196 30 557 A 1

- ⑦① **Anmelder:**
Schuppan, Detlef, Priv. Doz. Dr. Dr., 12163 Berlin, DE;
Dieterich, Walburga, 89584 Ehingen, DE
- ⑦④ **Vertreter:**
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin
- ⑦② **Erfinder:**
Schuppan, Detlef, Dr.Dr., 12200 Berlin, DE; Dieterich,
Walburga, 89584 Ehingen, DE; Ehnis, Tobias, 14197
Berlin, DE

- ⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**
- EP 03 21 988 A1
Datenbank: CA auf STN. ACS, AN 108:202164,
benutzt am 27.03.97, AB. SHARP, G. u.a., in: Cell
Biochemistry and Function, 1988, Bd. 6, Heft 2,
S. 137-141;
Datenbank: MEDLINE auf STN. Derwent,
AN 85152939, benutzt am 27.03.97, AB. BRUCE, S. E.
u.a., in: Clinical Science, 1985, Bd. 68, Heft 5,
S. 573-579;
Datenbank: MEDLINE auf STN. Derwent, AN,
benutzt am 27.03.97, AB. SZABOLCS, u.a., in: Acta
Paediatrica Hungarica, 1987, Bd. 28, Heft 3-4,
S. 215-227;
Datenbank: BIOSIS auf STN, Derwent,
AN 97:278359, benutzt am 07.11.97, AB. DIETRICH,
W. u.a., in: Digestive Disease Week and the 97th
Annual Meeting of the American
Gastroenterological Association, Washington, D.C.
U.S.A., Mai 11-14, 1997;
Gastroenterology, 1997, Bd. 112, Suppl. 4;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ **Gewebe-Transglutaminase (EC 2.3.13, tTG), in der Eigenschaft als Autoantigen der einheimischen Sprue/Zöliakie, welches spezifisch durch Antikörper aus Seren von Patienten mit einheimischer Sprue erkannt wird; deren Verwendung in Diagnostik, Therapiekontrolle und Therapie der Sprue, sowie anderer Erkrankungen/Symptome, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen**
- ⑤⑦ **Die bisherigen Methoden zur Diagnostik und Therapiekontrolle der Sprue beruhen auf der Dünndarm-Biopsie und unbefriedigenden immunologischen Verfahren, insbes. dem Nachweis von Gliadin-Antikörpern mit geringer Spezifität im ELISA oder Endomysium-Antikörpern in aufwendigen Immunfluoreszenzen. Das neue Verfahren stellt einen hochsensitiven und leicht durchführbaren Test dar. Durch die Entdeckung der Gewebe-Transglutaminase als Autoantigen der Sprue kann diese gezielt in hochspezifischen, nicht-invasiven, standardisierbaren, schnell, leicht und kostengünstig durchführbaren Immunologischen Tests, z. B. mittels ELISA, zur Diagnostik und Therapiekontrolle der Sprue sowie anderer Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen, eingesetzt werden. Es besteht ferner die Möglichkeit zum Einsatz des Autoantigens oder seiner Analoga zur oralen Induktion einer Immuntoleranz. Diagnostik, Therapiekontrolle und Therapie von Erkrankungen (z. B. Sprue), die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen.**

DE 196 30 557 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 97 702 065/599

18/25

1. Titel

Gewebe-Transglutaminase (EC 2.3.2.13, tTG), in der Eigenschaft als Autoantigen der einheimischen Sprue/Zöliakie, welches spezifisch durch Antikörper aus Seren von Patienten mit einheimischer Sprue erkannt wird; deren Verwendung in Diagnostik, Therapiekontrolle und Therapie der Sprue sowie anderer Erkrankungen/Symptome, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen.

2. Stand der Forschung

2.1 Definition der einheimischen Sprue / Zöliakie

Die Zöliakie ist eine Erkrankung der Dünndarmschleimhaut mit Erstmanifestation vorwiegend im späten Säuglings- und Kleinkindalter. Tritt das entsprechende Krankheitsbild erst beim Erwachsenen auf, so wird sie als einheimische Sprue bezeichnet. Die Sprue geht mit einer entzündlichen Veränderung der Mukosa und einer dadurch verursachten generalisierten Malabsorption einher. Sie reagiert meist morphologisch und klinisch auf eine Behandlung mit glutenfreier Diät (1, 2).

Bei der als latente Sprue, bzw. Gluten-Sensitivität bezeichneten symptomfreien Ausprägung sollte zwischen einer mukosalen und einer klinischen Latenz unterschieden werden. Während bei der mukosalen Latenz von einer milden Schädigung der Mukosa ausgegangen wird, die durch Zugabe von Gluten verstärkt werden kann, können Personen mit einer klinischen Latenz alle Phasen der Mukosa-Schädigung entwickeln und dennoch symptomfrei bleiben.

2.2. Genetische Marker

Zwischen der Sprue und bestimmten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Antigenen besteht eine enge Assoziation. Die Gene, die für die MHC-Antigene kodieren, sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Sie werden als humane Lymphozyten (HLA)-Antigene A, -B, -C und -D bezeichnet. Die HLA-DQ und HLA-DR Allele (MHC II) scheinen eine besondere Rolle bei der Entwicklung der Sprue zu spielen (1, 2).

2.3 Auslösende Faktoren, Prävalenz und Inzidenz

Als krankheitsauslösende Faktoren sind die Klebereiweiße (Glutene) von Weizen, Gerste, Roggen und z. T. Hafer bekannt, während die von phylogenetisch weniger verwandten Pflanzenarten wie Mais, Reis und Soja nicht pathogen sind. Unter den Glutinen wird den alkohollöslichen Prolaminen, speziell dem α -Gliadin, die Rolle des krankheitsauslösenden Agens zugeschrieben (1, 2).

Die Sprue tritt daher bevorzugt in Ländern auf, in denen Weizen als wichtige Nahrungsquelle dient (Europa, USA, Australien) und besitzt z. B. eine Inzidenzrate von 0,14/1000 Neugeborener in Dänemark, 0,7/1000 in Spanien, 1/1000 in Italien, 0,45/1000 in Deutschland und 2,42/1000 in Schweden (1, 2, 3).

Neuere Untersuchungen belegen jedoch, daß eine subklinische Ausprägung, d. h. eine morphologische Veränderung der Mukosa ohne schwerwiegende Sym-

ptome, weit häufiger als bislang vermutet auftritt. So zeigte eine 1994 in Italien durchgeführte Studie eine Inzidenz von 3,28/1000 bei Schulkindern (4). Das Risiko einer latenten Sprue bei Verwandten 1. Grades von Sprue-Patienten liegt bei bis zu 50% (5).

2.4. Pathogenese und Immunität

Unter mehreren Hypothesen wird eine Interaktion zwischen genetischen Faktoren, Umweltfaktoren und dem Immunsystem favorisiert.

In den Seren der Sprue-Patienten kommen Antikörpern der IgA- und der IgG-Klasse vor, die zum einen gegen Gliadin gerichtet sind, zum anderen gegen ein Autoantigen des Endomysiums, einem speziellen Bindegewebe, das u. a. die Kollagene I, III und V, elastische Fasern, nichtkollagene Proteine wie z. B. Fibronectin und Proteoglykane enthält.

2.5. Morphologie der Sprue

Eine Dünndarm-Biopsie weist bei Sprue-Patienten charakteristische Schleimhautläsionen auf. Beginnend mit der Einwanderung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) kommt es bei fortschreitender Sprue-Entwicklung zur Hyperplasie der Krypten sowie einer Atrophie der Villi, was zum typischen Erscheinungsbild einer flachen Mukosa führt. Der proximal gelegene Teil des Dünndarms ist dabei stärker betroffen als der distale Bereich (2).

Während bei allen symptomatischen Patienten eine flache Mukosa diagnostiziert wird, können bei der asymptomatisch verlaufenden, latenten Sprue alle Phasen der Mukosa-Veränderung, vom Einwandern der IEL bis hin zur totalen Villus-Atrophie beobachtet werden (5).

2.6. Sprue-assoziierte Erkrankungen und Komplikationen

Mit einer vorwiegend latenten Sprue einhergehend tritt gehäuft eine polymorphe Dermatoze, die Dermatitis herpetiformis auf, wobei charakteristische subepidermale Bläschen mit granulären IgA-Ablagerungen in den dermalen Papillenspitzen zu beobachten sind. Dünndarmbiopsien zeigen eine unregelmäßige, mehr oder weniger stark geschädigte Mukosa.

Eine weitere gesicherte Assoziation ist zwischen der Sprue und dem Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, Schilddrüsenerkrankungen, sowie einer selektiven IgA-Defizienz zu beobachten. Eine Sprue wurde auch in einigen Patienten mit Sjögrens Syndrom, seltener bei systemischem Lupus erythematosus, Enzephalopathien, Polymyositis und distaler Axonopathie beschrieben. Neben zahlreichen klinischen Begleiterscheinungen der Sprue, wie z. B. einer Anämie, die u. a. einer Vitamin B₁₂-Malabsorption zugeschrieben wird und einem Vitamin K-Mangel, auf den eine erhöhte Blutungsneigung zurückzuführen ist, spielt das stark erhöhte Risiko gastrointestinaler Malignome eine besondere Rolle. Bis zu 15% der Sprue-Patienten entwickeln, meist im Alter über 50 Jahren, neoplastische Erkrankungen, von denen etwa 50% auf intestinale T-Zell-Lymphome und weitere 25% auf Ösophagus-, Oropharynx- und Dünndarm-Tumore entfallen (1).

2.7. Diagnostik

Die Dünndarm-Biopsie ist der Goldstandard für die Diagnose der Sprue und der Verlaufskontrolle unter glutenfreier Diät. Zunehmend gewinnen aber auch nicht-invasive Methoden der Diagnostik an Bedeutung, die auf immunologischen Markern beruhen. Seren können dabei im ELISA auf IgG- und IgA-Antikörper gegen Gliadin, sowie durch indirekte Immunfluoreszenz auf IgG- und IgA-Antikörper gegen Endomysium getestet werden. Während Antikörper gegen Gliadin nicht spezifisch genug für die Sprue sind, wird für die IgA-AK gegen Endomysium eine hohe Sensitivität und Spezifität (97–100%) berichtet. Für den Immunfluoreszenz-Nachweis werden Ösophaguschnitte von Primaten benötigt (6). Zur Zeit laufen Untersuchungen, die Endomysium-Antikörper auch auf Nabelschnurmateriale nachzuweisen (7).

2.8. Therapie

Die Therapie besteht in der strikten Einhaltung einer lebenslangen glutenfreien Diät, wobei nicht nur Gluten enthaltende Produkte aus Weizen, sondern auch aus Roggen, Gerste und Hafer ausgeschlossen werden müssen. Dies bedeutet für die Patienten gravierende Einschränkungen sowohl der Essensgewohnheiten als auch der sozialen Interaktionen.

2.9. Prognose

Sofern die Sprue rechtzeitig diagnostiziert und therapiert wird, besitzt sie eine gute Prognose. Jedoch sind aufgetretene Komplikationen häufig nicht gänzlich reversibel. Wird die Krankheit dagegen nicht erkannt und behandelt, so kann es durch Malabsorption zu schwerwiegenden Krankheitserscheinungen kommen. Letztendlich besteht das erhöhte Risiko einer Entwicklung eines intestinalen Lymphoms, sowie anderer gastrointestinaler Neoplasien.

3. Fragestellung (Problem)

Bei rechtzeitiger Diagnose und konsequenter Einhaltung einer glutenfreien Diät kann die Erkrankung in Remission gehalten und damit auch das erhöhte Malignom-Risiko der Patienten auf den Normalwert gesenkt werden (8, 9). Es ist folglich von großem Interesse, einen geeigneten Nachweistest für die Sprue zu entwickeln. Da der Personenkreis mit einer latenten Sprue ebenfalls zur Risikogruppe gehört, sollten alle in Betracht kommenden Personen (vor allem Verwandte 1. Grades), letztendlich alle Schulkinder, wie dies in Italien zur Zeit erwogen wird, mit einem sensitiven, spezifischen, leicht durchführbaren und preiswerten Test untersucht werden.

Große Screening-Programme scheiterten an folgenden Problemen:

- Die invasiven Duodenal-Biopsien symptomfreier Personen sind unzumutbar und viel zu aufwendig.
- Ein auf Antikörpern gegen Gliadin beruhender ELISA-Nachweis ist aufgrund seiner geringen Spezifität kaum brauchbar.
- Der auf Primaten-Ösophagus basierende Immunfluoreszenz-Nachweis von Endomysium-Antikörpern der IgA-Klasse ist als generelle Screening-

methode zu aufwendig. Ferner ist die Beurteilung subjektiv und erlaubt nicht die Erfassung von Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz (2% der Patienten).

Es existiert bisher kein nicht-invasiver, spezifischer, quantitativer, schnell, leicht und kostengünstig durchzuführender Nachweistest für die Sprue/Zöliakie und deren Therapie-Kontrolle. Diese Probleme können durch die im Patentanspruch angegebene Entdeckung und Charakterisierung des Autoantigens und dessen Verwendung in der Diagnostik und Therapiekontrolle der Sprue gelöst werden.

Des weiteren können durch die im Patentanspruch aufgeführten immunologischen Verfahren andere Erkrankungen/Symptome diagnostiziert und kontrolliert werden, welche mit einer Immunreaktion gegen das dem Antrag zugrundeliegende Autoantigen einhergehen. Ferner werden Wege aufgezeigt, auf denen vom Autoantigen abgeleitete Therapieformen eingesetzt werden können.

4. Lösung des Problems

4.1. Isolierung und Charakterisierung des Autoantigens

4.1.1. Immunfluoreszenz, APAAP-Färbungen

Die Färbungen wurden auf verschiedenen, in 100% Methanol über 2 min bei -20°C fixierten Zelllinien, durchgeführt.

Beim Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Präparate mit Sprue- bzw. Kontrollseren inkubiert, gewaschen und mit einem TRITC-markierten anti-human-IgA aus Kaninchen detektiert (10).

APAAP-Markierungen wurden nach Inkubation der Zellen mit den Sprue-Seren, Waschen und der darauffolgenden Detektion mit dem APAAP-Komplex durchgeführt (11).

Dabei zeigten HT1080 (humane Fibrosarkom-Zellen), WI38 (humane embryonale Lungenfibroblasten), Hep1 und HepG2 (Hepatokarzinom-Zellen) mit den Patientenseren eindeutig positive, zytoplasmatische Signale, wogegen Normalseren oder auch eine Vorbehandlung mit humanem IgA keine Markierung zeigten. Humane Vorhautfibroblasten, humane Rhabdomyosarkom (RD) / Ratten-Ito / Ratten-Morris-Hepatom- und Hund-MDCK-Zellen zeigten nur sehr schwache bis negative Reaktionen.

4.1.2. Metabolische Zellmarkierung und Immunpräzipitation des Autoantigens

Die Charakterisierung und Isolierung des Autoantigens wurde aus HT1080 Zellen durchgeführt.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit L-Alanyl-L-Glutamine, 10% fötalem Kälberserum (FKS, Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Seromed) bei 37°C und 8% CO_2 kultiviert. Zur metabolischen Markierung wurden die Zellen in Kulturschalen mit 5 cm^2 Durchmesser überführt und bei Erreichen einer ~ 90%-igen Konfluenz 2 h in Methionin- und FKS-freiem Medium gehalten, bevor dieses gegen 3 ml FKS-freies, ^{35}S -Methionin (0,2 mCi, Expre ^{35}S , NEN-Dupont) enthaltendes Medium ausgetauscht wurde. Nach 16–20-stündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed) ge-

spült und anschließend in 3 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% nichtionisches Detergenz IGEPAL CA-630 [Sigma], Proteaseinhibitor Complete[®] [Boehringer], pH 7,5) lysiert. Im Anschluß wurde sowohl mit dem Medium als auch dem Zellysat eine Immunpräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia) durchgeführt.

Die Aktivierung und Bindung an die Sepharose erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem Quellen und Waschen in 1 mM HCl, pH 2,5 wurde die CNBr-aktivierte Sepharose in 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3, mit einem gegen humanes IgA gerichteten Antikörper aus Kaninchen (Dianova, 2,4 mg Antikörper/ml Sepharose) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit dem Bindungspuffer entfernt, nicht besetzte Bindungsstellen durch Zugabe von 1 M Ethanolamin, pH 9,0, bei Raumtemperatur 2 h abgesättigt. Danach wurde die Sepharose 3 × alternierend (je 10 × Vol.) mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0, und 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0, gespült. Es folgte eine Inkubation der Sepharose mit Seren von Sprue-Patienten bzw. gesunden Personen (0,5 ml Serum/ml Sepharose) bei 4°C über Nacht in Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 8,0). Überschüssige Serum-Antikörper wurden durch 3 × Spülen mit Bindungspuffer entfernt.

Je 1 ml HT1080-Medium oder Zellysat (ca. 5 × 10⁴ Zellen) der metabolisch markierten Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µl Cl4B-Sepharose (Pharmacia) vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach Abzentrifugieren (10 000 × g, 5 min, 4°C) wurden die Überstände mit je 50 µl der Sepharose, an die zuvor IgA der Patienten bzw. Kontrollpersonen gebunden wurde, über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Sepharose-Pellets je 3 × mit 1 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 1% IGEPAL CA-630 [Sigma], 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% Natriumlaurylsulfat, Complete[®] [Boehringer], pH 8,0) gewaschen, gefolgt von 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Danach wurden die Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C 5 min unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen inkubiert, im 10–12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (12) und in der Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 1).

Das gebundene hochmolekulare Protein aus dem Medium erwies sich bei weiteren Untersuchungen als Fibronectin, welches u. a. unspezifisch an die Sepharose gebunden wird. Eine zellassoziiertes Protein von 85 kDa konnte jedoch mit allen 30 bisher 59 eingesetzten Sprue-Seren präzipitiert werden, während dies mit 15 Kontrollseren, darunter Normalseren, Seren von Patienten mit Colitis Ulcerosa und Sjögrens-Syndrom, nicht möglich war. Hieraus wurde gefolgert, daß dieses Protein das wesentliche Autoantigen der Sprue repräsentiert. Der autoradiographisch sichtbaren 85 kDa-Bande wurde in einer Proteinfärbung der Gele mit Silbernitrat (13) eine scharfe Proteinbande zugewiesen.

4.1.3. Isolierung und Aufreinigung des 85 kDa Autoantigens

Zur Isolierung größerer Mengen des Autoantigens wurden insgesamt 65 Kultuschalen (je 175 cm²) der HT 1080 Zellen (etwa 10⁹ Zellen) kultiviert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurde das Medium gegen FKS-freies Medium ausgetauscht, gefolgt von einer Inkubation über weitere 16–20 h im CO₂-Inkubator. Die Lyse bzw. Immunpräzipitation erfolgten wie oben beschrieben.

Das Sepharosepellet wurde in insgesamt 4,5 ml SDS-Probenpuffer mit 2% DL-Dithiothreitol (Sigma) 5 min bei 95°C inkubiert, um gebundene Proteine zu lösen und anschließend im analytischen SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

Zur weiteren Aufreinigung des Autoantigens wurde das Immunpräzipitat über eine Elutionselektrophorese mit einer Prep Cell (Model 491 BIO-RAD) wie folgt aufgetrennt:

10 Auf ein Rundgel (Außen-Durchmesser 3 cm), bestehend aus 6,5 cm Trenngel (8% Polyacrylamid, pH 8,8) und 1,5 cm Sammelgel (4% Polyacrylamid, pH 6,8) wurden die 4,5 ml des Proteingemisches aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen Proteine wurden im Elutionspuffer (25 mM Tris-HCl, 0,1 M Glycin, 0,01% SDS, pH 8,3) in Fraktionen à 1,2 ml (0,8 ml/min) gesammelt. Die eluierten Fraktionen wurden in der SDS-PAGE kontrolliert und die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen (etwa 15 ml) vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltration (Amicon Centriprep-50 bei 1000 × g) auf circa 1 ml Gesamtvolumen aufkonzentriert.

4.1.4. Protease-Verdau des Autoantigens

Unter mehreren getesteten Proteasen wurde die Endoproteinase Asp-N (sequencing grade, Boehringer Mannheim) als zur Fragmentierung geeignet ermittelt, da sie ein weitestgehend reproduzierbares Spaltmuster mit relativ gut trennbaren Fragmenten ermöglichte. Die Enzym- zu Substratkonzentration wurde auf 1 : 100 eingestellt und der Verdau über 30 min bei 37°C durchgeführt.

4.1.5. Transfer auf PDVF-Membran

Nach Verdau des aufgereinigten Autoantigens wurden die Peptidfragmente auf einem präparativen 10% Tricine-Gel aufgetrennt (14) (Abb. 2) und bei 4°C im Semi-Dry-Fastblot-Verfahren unter Verwendung graphithaltiger Elektrodenplatten (Fastblot B32/33, Biometra) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, ImmobilonTM, Millipore) transferiert. Dazu wurden folgende Schichten auf die Anodenplatte gelegt: 1.) ein Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer 1 (300 mM Tris-HCl, 20% Methanol, pH 10,4), 2.) ein Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer 2 (30 mM Tris-HCl, 20% Methanol, pH 10,4), 3.) die PVDF-Membran, aktiviert in Methanol und präequilibriert in Anodenpuffer 2, 4.) das Tricine-Gel, 5.) zwei Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer (25 mM Tris-HCl, 40 mM ε-Amino-n-Capronsäure, 20% Methanol, pH 9,4), 6.) die Kathodenplatte. Der Transfer wurde 35 min bei 180 mA durchgeführt.

Die PVDF-Membran wurde daraufhin in 0,1% Coomassie Blue Serva R-250, 50% Methanol für 5 min gefärbt, mit 50% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt, gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Charakteristische Banden des verdauten Autoantigens bei 10 kDa, 14 kDa, 16 kDa und 25 kDa wurden sorgfältig ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert.

4.1.6. Edman-Abbau (15)

Die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 4778-Sequenator ergab drei Aminosäure-Sequenzen, welche mit der Swiss-Prot 31 Datenbank (von PC/GENE, IntelliGenetics) verglichen wurden. Daraus konnte

bei minimaler Diskordanz, eine eindeutige Zuordnung der drei Fragmente zur humanen Gewebe-Transglutaminase (tTG, EC 2.3.2.13, Protein-Glutamin Gamma-Glutamyltransferase) gemacht werden; die Angaben erfolgen im "one letter code", X bedeutet keine Identifizierung:

t-Transglutaminase: 28' REKLVVRRGQPFW
10 kDa-Fragment: REKLVVRRGQPF(S)
t-Transglutaminase: 581' DLYLENPEIKIRILG
14 kDa-Fragment: DLYLENPEIXILG
t-Transglutaminase: 438' DITHTYKYPE
16 kDa-Fragment: DITLTYQYP(V)

Dem 25 kDa-Fragment konnte keine eindeutige Sequenz zugeordnet werden, da es sich dabei um ein Peptidgemisch handelt.

4.2. Bestätigung der Gewebe-Transglutaminase (tTG) als Sprue-Autoantigen

4.2.1. Immunpräzipitation der tTG vom Meerschweinchen

Bei kommerzieller Verfügbarkeit und einer Sequenz-Homologie (>80%) zur humanen tTG wurde die tTG aus der Leber des Meerschweinchen (Sigma) zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt, um dessen Reinheit zu überprüfen. Die tTG stellt dabei neben mehreren anderen Proteinen mit ca. 50% eine der Hauptbanden dar.

Obwohl sich die humane tTG mit 687 Aminosäuren nur geringfügig vom Meerschweinchenprotein mit 690 Aminosäuren unterscheidet, besitzen die beiden Proteine ein sehr unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel. Während das Protein tierischen Ursprungs erwartungsgemäß bei 75–80 kDa erscheint, wandert das humane Protein deutlich weniger schnell und täuscht, wie auch in der Literatur beschrieben, trotz offenbar fehlender N-Glykosylierung ein apparentes Molekulargewicht von 85 kDa vor (16).

Die Reaktivität des menschlichen Auto-Antikörpers aus Sprue-Seren mit der Meerschweinchen-tTG wurde in einer Immunpräzipitation getestet. Dazu wurden 4 µg tTG (Sigma) in 500 µl Lysispuffer, 0,5% Rinderserumalbumin mit an 4B-Sepharose gekoppeltem Sprue-IgA bei 4°C über Nacht geschüttelt, gewaschen, in SDS-Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen gekocht und im 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 4.1.2.). Hier zeigte sich eine spezifische Präzipitation der erwarteten Bande (M_r 80 kDa) nicht aber der Verunreinigung.

4.2.2. Bestätigung der tTG als Autoantigen im Westernblot

Nach Auftrennung von 2 µg der tTG aus Meerschweinchen im SDS-Gel und Transfer auf Nitrozellulose wurde der Blot bei 4°C in PBS, 2% fettarmen Magermilchpulver, 0,3% Tween 20, pH 7,3 über Nacht blockiert. Es folgten eine einstündige Inkubation mit Sprue-Serum (1/200) in demselben Puffer, drei Waschschriffe und eine einstündige Inkubation mit an alkalischer Phosphatase gekoppeltem Antikörpern aus Kaninchen gegen humanes IgA (1/500). Die Blots wurden in PBS gewaschen und mit Nitro Blue Tetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat als Substrat entwickelt (17).

Die 75–80 kDa-Bande ergab ein eindeutiges positives Signal mit dem Sprue-Serum, als weiterer Beweis dafür, daß die Seren von Sprue-Patienten Antikörper der IgA-Klasse gegen die tTG 30 enthalten, während 5 Kontrollseren kein Signal ergaben.

4.2.3. Bestätigung der tTG als das Endomysium-Autoantigen in der indirekten Immunfluoreszenz

Ösophagus-Gewebeschnitte von Primaten (Euroimmun, Deutschland) wurden zum indirekten Nachweis der IgA-Antikörper gegen Endomysium in Sprue-Seren, bzw. deren Inhibition durch tTG verwendet. Nach Vorinkubation von 10 µl des 1/320 in PBS verdünnten Patientenserums mit 0,5 oder 10 µg tTG aus Meerschweinchen (Sigma) bzw. 10 µg BSA (Sigma) über 1 h bei Raumtemperatur, erfolgte dessen Inkubation mit den Ösophagus-Schnitten 1 h bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre. Zur Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienten Sprue-Serum (1/320) bzw. Seren von Gesunden (1/50). Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS/0,2% BSA und Lufttrocknen wurde die Detektion des Autoantigens mit einem TRITC-markierten, gegen humanes IgA gerichteten, Antikörper aus Kaninchen (Dianova), 1/50 in PBS verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Überschüssige Antikörper wurden durch sukzessives Waschen mit PBS/0,2% BSA, PBS und destilliertem Wasser entfernt. Das Patientenserum zeigte eine deutliche Anfärbung der EZM durch die Antikörper der IgA-Klasse, die durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an tTG inhibiert wurden, nicht jedoch durch Vorinkubation mit BSA. Die Kontrolle mit Serum von Gesunden zeigte keinerlei Anfärbung der Ösophagus-Schnitte.

4.3. Struktur der Transglutaminasen

Die TGn (EC 2.3.2.13) sind Enzyme, die Ca²⁺-abhängig einen Acyltransfer katalysieren, wobei die γ-Carboxamidgruppen von Peptid-gebundenen Glutaminresten als Acyl-Donoren agieren. Als Acyl-Akzeptoren dienen primär proteingebundene Lysinreste, so daß der Transfer in einer ε-(γ-Glutamyl-) Lysin-Bindung resultiert. Die Substratspezifität der TGn bezüglich der Acyl-Donoren ist sehr hoch (Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz), wohingegen ein außergewöhnlich breites Spektrum an Akzeptoren zur Verfügung steht (18). Die entstandenen kovalenten Peptidbindungen sind sehr stabil und proteaseresistent, wodurch sich eine erhöhte Beständigkeit der vernetzten Proteine gegenüber chemischen, enzymatischen oder physikalischen Einflüsse ergibt.

Mit dem weitverbreiteten Vorkommen verschiedener TGn in diversen Organen, Geweben, im Plasma und in interstitiellen Körperflüssigkeiten korreliert auch das Vorkommen von durch Transglutaminase modifizierten Proteinen im Blutgerinnsel, auf Zellmembranen, in der Hornschicht der Epidermis, in Haaren, Nägeln und in der extrazellulären Matrix (19).

Die beschriebenen Transglutaminasen lassen sich durch ihre physikalischen Eigenschaften, ihre Lokalisation im Körper und ihre Primärstruktur unterscheiden.

Faktor XIII (FXIII), ein im Blut zirkulierendes Plasmaprotein, stellt die am besten charakterisierte TG dar. Im Plasma liegt FXIII als Tetramer von 320 kDa vor, bestehend aus zwei katalytischen α-Untereinheiten (je 75 kDa, mit 39% Homologie zur tTG) und zwei vermut-

lich stabilisierenden b-Untereinheiten (je 80 kDa). Eine lediglich aus zwei a-Untereinheiten bestehende Variante findet sich u. a. in Plättchen, Makrophagen, Plazenta, Uterus und Prostata. Im Gegensatz zu den anderen TGn wird der als Proenzym vorliegende FXIII durch Thrombin aktiviert, indem ein 4 kDa Peptid am Aminoende der a-Untereinheit abgespalten wird. In Gegenwart von Ca^{2+} dissoziiert das Tetramer in das aktive a-Dimer und die zwei b-Untereinheiten. Die Kalziumionen binden an die a-Untereinheiten und aktivieren das Enzym zu FXIIIa.

FXIIIa katalysiert die Quervernetzung zahlreicher Plasmaproteine, insbes. der Fibrinmonomere, ein entscheidender Schritt in der Blutgerinnung. Bei der Regulation der Fibrinolyse spielt FXIIIa durch das Vernetzen von α_2 -Plasmin-Inhibitor mit der α -Kette des Fibrins eine wichtige Rolle. Ferner kann FXIIIa Fibronectin mit der α -Kette des Fibrins bzw. Kollagenen quervernetzen (20).

Aus Epidermis-Zellen konnte die epidermale TG isoliert werden, die als Protransglutaminase mit 72 kDa durch chaotrope Agenzien oder Proteolyse in das aktive 50 kDa-Fragment überführt wird. Ihr wird Bedeutung bei der Quervernetzung von zytoplasmatischen oder Membranproteinen in der Epidermis zugeschrieben. In welchem Verhältnis die epidermale TG zur Haarfollikel-TG steht, die als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten von je 27 kDa besteht, bleibt noch zu klären (19, 20).

Eine ebenfalls auf die Haut beschränkte TG konnte aus Keratinozyten gewonnen werden und liegt primär membranengebunden vor. Die Membran-Verankerung der TG_K erfolgt über eine posttranslationale (thio-) Veresterung mit Palmitin-/ oder Myristinsäure. Milder Trypsinabbau bewirkt eine Entfernung der Peptid-gebundenen Fettsäure, eine Reduktion des Molekulargewichts von 90 auf 80 kDa und die Solubilisierung des Enzyms (19).

Die Gewebe-TG (tTG), das dem Patentantrag gemäß Anspruch 1 zugrundeliegende Molekül, auch zelluläre, Erythrozyten-, endotheliale, zytoplasmatische, Leber- oder Typ II-TG genannt, ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 75–85 kDa.

Die komplette Aminosäuresequenz mit 687 Resten wurde von der cDNA abgeleitet. Auf Protein-Ebene besteht eine 84%ige Homologie zwischen dem menschlichen Enzym und dem Enzym aus Mausmakrophagen, sowie eine 81%ige Homologie zwischen dem menschlichen und dem Meerschweinchen-Enzym. Nukleotidaustausche zwischen den Spezies sind oftmals ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Stark konserviert ist das aktive Zentrum mit einer ausgeprägten Protein-Homologie zwischen den drei Spezies (49 von 51 Resten sind identisch) und einem hohen Grad an Protein-Homologie (75%) zur a-Untereinheit des Faktor XIII (16, 19).

Es liegen weder ein Signalpeptid noch eine Glykosylierung vor, und trotz mehrerer Cysteinreste existieren offenbar keine Disulfidbrücken (20). Fluoreszenz-Hybridisierungen lokalisierten das Gen für die humane Gewebe-Transglutaminase auf dem Chromosom 20q12 (21).

4.4. Bisher bekannte Funktionen der tTG

Obwohl der Mechanismus der Enzym-Ausschleusung noch unklar ist, gibt es eindeutige Belege, daß die intrazellulär ubiquitär vorkommende tTG in der extrazellu-

lären Matrix (EZM) wichtige Aufgaben übernimmt. Zudem wird die für die Aktivität der tTG erforderliche Ca^{2+} -Konzentration unter physiologischen Bedingungen intrazellulär kaum erreicht, während im Extrazellulärraum dagegen ausreichend hohe Ca^{2+} -Konzentrationen vorliegen (22).

Mehrere Untersuchungen belegen eine Assoziation von tTG mit dem EZM-Protein Fibronectin, wobei die Bindung durch 10 mM CaCl_2 , MgCl_2 , SrCl_2 oder MnCl_2 gesteigert (23), durch 10 mM BaCl_2 , CuCl_2 oder ZnCl_2 gehemmt wird (24). Die hochaffine Bindung von tTG an Fibronectin kann durch Inkubation mit 2 M KSCN gelöst werden, nicht jedoch durch Zugabe von 4 M KCl, 2 M NaCl, 2 M CaCl_2 , 3 M MgCl_2 , 50 mM DTT, 25% Glycerin, 0,1 M Glycin, pH 2,5 oder 6,2, 0,5 M Arginin, 4 M Guanidin-HCl oder 6 M Harnstoff (23). In Studien an Kaninchen-Hepatozyten konnte die Bildung eines hochmolekularen Komplexes an der Zelloberfläche, bestehend aus Fibronectin, Fibrinogen und inkorporierter tTG nachgewiesen werden. Inwieweit die TG eine kovalente Vernetzung von Fibronectin katalysiert, an welcher auch andere EZM-Bestandteile teilnehmen können, bleibt zu klären (25). Klarheit besteht jedoch darüber, daß eine durch tTG gesteuerte Fibronectin-Vernetzung zur Stabilität der EZM beiträgt sowie eine feste Verankerung der Zellen an der Basalmembran bewirkt (26). Transfektionsversuche an 3T3-Fibroblasten der Ratte mit tTG bestätigten eine verstärkte Adhäsion der Zellen an die EZM, mit einer deutlich erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Proteasen wie Trypsin. Diese Vernetzung wirkt sich auch auf die Zell-Morphologie aus (22).

Neben Fibronectin (23, 24, 26) konnten auch die EZM-Moleküle Nidogen (27), das N-terminale Prokollagen III-Peptid (28), die Kollagene V und M (29), Osteonectin (30), ein Mikrofibrillenassoziiertes Glykoprotein (31), hochmolekulares Dermatan Sulfat-Proteoglykan (32) und das Lektin Galectin 3 (33) als spezifische Substrate für die tTG identifiziert werden.

Hinweise für eine wichtige Rolle der tTG an der Wundheilung kamen u. a. von Immunfluoreszenz-Studien an kultivierten WI38-Zellen (embryonalen Lungenfibroblasten), die unter Normalbedingungen keine extrazelluläre tTG-Aktivität aufweisen, das Enzym jedoch nach künstlicher Wundsetzung extrazellulär ablagern. Dem möglicherweise passiven Austritt des Enzyms aus geschädigten Zellen schließt sich eine zunächst nicht-kovalente Bindung an die EZM, insbesondere an Fibronectin und fibrilläre Kollagene an. Dort ist das Enzym einige Stunden katalytisch aktiv (23). Am Rattenmodell wurde, ebenfalls nach künstlicher Wundsetzung, 5 Tage lang eine erhöhte tTG-Aktivität nachgewiesen (34). Auch bei der Inkubation von humanen Erythrozytenlysaten mit Plasma konnte eine starke Affinität der freigesetzten tTG an Fibronectin demonstriert werden (35). Alle Befunde deuten darauf hin, daß die an die EZM gebundene tTG eine zentrale Rolle in der frühen Phase der Wundheilung übernimmt, insbes. zusammen mit Faktor XIIIa bei der Fibrin-Stabilisierung mitwirkt und durch ein Quervernetzen von extrazellulären Proteinen eine Schutzschicht und ein stabiles adhäsives Substrat um die geschädigten Zellen bildet (23). Eine interessante Hypothese sieht in der Bindung der tTG an extrazelluläres Fibronectin bei pathologischen Situationen, in denen es zum Austritt von tTG aus dem Gewebe kommt, eine Schutzreaktion der Zelle, um gefährliche Effekte von Fremdproteinen abzuwehren (35).

Bisher konnten in Vertebraten keine Enzyme nachge-

wiesen werden, die in der Lage sind, die von der tTG katalysierten, überaus stabilen Quervernetzungen der Proteine zu spalten. In diesem Zusammenhang konnte zunehmend eine Bedeutung der tTG bei der Apoptose, d. h. dem programmierten Zelltod, aufgezeigt werden. Im Gegensatz zur Nekrose (ungeregelte Zellyse) durchlaufen die Zellen bei der Apoptose ein physiologisches Suizid-Programm, das einen aktiven Metabolismus und eine gezielte Proteinsynthese benötigt und immunologisch unauffällig verläuft. Apoptose erfolgt während der Embryonalentwicklung, der Metamorphose, bei Hermon-induzierten Atrophien, beim Tumorwachstum und der geregelten Immunantwort (Immuntoleranz). Sie reguliert die Zellzahl durch Eliminierung geschädigter oder potentiell schädlicher Zellen. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch intakte Organellen und Plasmamembranen, eine signifikante Volumenverminderung, typische Chromatinkondensation und letztendlich eine Fragmentierung in die sogenannten Apoptosekörper aus (36). Bei Beginn der Apoptose findet eine Induktion und Aktivierung der tTG mit vermehrter Ausbildung einer unlöslichen Proteinhülle statt. Dieses Phänomen geht auch mit einer Fixierung des Zytoskeletts durch tTG einher und verhindert so das Austreten intrazellulärer Bestandteile in den Extrazellulärraum mit einer konsekutiven Immunantwort (37).

Eine Stimulation der tTG-Transkription und -Expression durch den transformierenden Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) wurde an Ratten-Hepatoma-Zellen nachgewiesen. Die Induktion der tTG mit einer darauffolgenden gesteigerten Quervernetzung zellulärer Proteine könnte u. a. der durch TGF- $\beta 1$ verursachten Wachstums-suppression und Apoptose-Induktion zugrunde liegen (38). Interessanterweise spielt TGF- $\beta 1$ eine zentrale Rolle bei der Wundheilung und Fibrosierung. Eine ebenfalls steigernde Wirkung auf die tTG-RNA und Proteinexpression mit anschließender Apoptose, konnte durch Inkubation von Ratten-Tracheobronchialzellen mit Retinolsäure erreicht werden (39). Humane Leukämiezellen zeigten jedoch zellspezifische Unterschiede in der tTG-Induktion durch Retinolsäure (40).

Ferner war die Expression der zytosolischen tTG umgekehrt mit dem Metastasierungspotential von Hamster-Fibrosarkom und Maus-Melanomzellen korreliert (41). In den metastasierenden Hamster-Fibrosarkomzellen, nicht jedoch im Normalgewebe, wurde eine inaktive Form der tTG nachgewiesen. Die inaktive Variante (ca. 120 kDa) war deutlich größer als die aktive tTG und konnte durch Behandlung mit Trypsin oder Thrombin in die aktive Form überführt werden. Ob es sich hier um eine transkriptionell oder post-transkriptionell fehlgeleitete Expression handelt, ist noch unklar (42). Da aber auch eine positive Korrelation zwischen tTG-Aktivität und Metastasierungs-Potential von humanen Melanomen (43), und Ratten-Kolonkarzinom-Zellen beschrieben wurde, müssen weitere Studien zeigen, ob die Vernetzung der den Tumor umgebenden EZM durch tTG, diesen eventuell auch vor dem Angriff des Immunsystems schützen kann (44).

Interessant ist auch die Aktivitätssteigerung der Pankreas-Phospholipase A_2 (PLA $_2$) des Schweins durch posttranslationale, tTG-vermittelte kovalente Vernetzung von PLA $_2$ mit Polyaminen, welche intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegen, vor allem in sich schnell teilenden Zellen. Die durch tTG aktivierte PLA $_2$ könnte den Membran-Stoffwechsel rasch proliferierender Zellen und die Arachidonsäure-Kaskade stimulieren (45).

Desweiteren konnte die tTG als ein neues Mitglied der GTP bindenden Proteine identifiziert werden, wobei jedoch keine Homologien zu den bisherigen bekannten G-Proteinen bestehen. Eine Aktivierung durch den α_1 -adrenergen Rezeptor stimuliert die Bindung von GTP an tTG (46).

4.5. Neue Funktion der Gewebe-Transglutaminase (tTG) in der Quervernetzung von Gliadin

Während der durch die tTG katalysierten Reaktion ein breites Spektrum an Acyl-Akzeptoren zur Verfügung steht, sind nur wenige Moleküle in der Lage als Acyl-Donoren zu fungieren (s. 4.4.). In einem in vitro Versuch konnten wir den durch die tTG vermittelten Einbau von radioaktiv markiertem Putrescin in Gliadin und damit die Funktion von Gliadin als Donor-Substrat der tTG nachweisen. In 160 μ l Puffer (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl $_2$, pH 7,5) wurden 1 μ g Substrat (Gliadin bzw. Kontrollproteine wie Albumin), 2 μ Ci [3 H]-Putrescin und 1 μ g tTG (aus Meerschweinchen, Sigma) 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 50%-ige Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und die Proteine wurden bei 4°C über Nacht präzipitiert. Nach Zentrifugation wurden die Pellets mit 10%-iger TCA gewaschen, in SDS-Probenpuffer gelöst und einerseits in der SDS-PAGE aufgetrennt, andererseits zur Szintillationszählung verwendet. Während bei den Kontrollen kein Einbau an Putrescin festzustellen war, zeigte Gliadin sowohl durch die Daten der Szintillationszählung als auch in der SDS-PAGE einen deutlichen Einbau von [3 H]-Putrescin in Gliadin, was belegt, daß Gliadin ein exzellentes Substrat für die tTG darstellt.

4.6. Neue Funktion der Gewebe-Transglutaminase (tTG), dem Autoantigen der Sprue

Die Verwendung in der Diagnostik, Therapie-Kontrolle und Therapie der einheimischen Sprue/Zöliakie, sowie anderer Erkrankungen, die mit einer Immunantwort gegen die tTG einhergehen

4.6.1. Entwicklung eines Sprue-spezifischen ELISA mit IgA-Antikörpern zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Sprue gemäß Anspruch 2 und 4

In Polystyrol-Mikroplatten (Greiner Labortechnik, 96 Wells) wurde pro Vertiefung 1 μ g Meerschweinchen-Transglutaminase (Sigma T-5398) in 100 μ l PBS pipettiert und 2 h bei 37°C unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert. Nicht gebundene tTG wurde durch Spülen mit PBS (3 \times 200 μ l) entfernt, freie Bindungsstellen der Vertiefungen wurden mit 1% Rinderserumalbumin (Sigma) in 250 ml PBS über Nacht bei 4°C blockiert. Nach Waschen mit PBS/0,1% Tween-20 (3 \times 200 μ l) wurden die Vertiefungen mit sequentiellen Serum-Verdünnungen in PBS/0,1% Tween-20 (100 μ l) für 1 h bei Raumtemperatur unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert, mit PBS/0,1% Tween-20 (3 \times 200 μ l) gewaschen und daraufhin mit einem Peroxidase-konjugierten, gegen humanes IgA gerichteten Antikörper aus Kaninchen (Dianova) (1/400 in 100 μ l PBS/0,1% Tween-20) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS (3 \times) erfolgte eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit je 200 μ l 0,1M Citratpuffer, 17,6 mM H $_2$ O $_2$, 5,5 mM o-Phenylendiaminhydrochlorid (Sigma), pH 4,2 und die anschließende Detektion des

gebildeten Farbstoffs im ELISA-Reader (MRX, Dynatech Laboratories) bei 450 nm.

Getestet wurden 20 Seren von Sprue-Patienten vor und nach Therapie mit Gluten-freier Diät, d. h. in der aktiven und weniger aktiven Phase der Erkrankung. Das Testsystem erwies sich als hoch sensitiv, mit einer guten Korrelation der Werte zur aktiven Phase der Sprue. Die Therapie-Erfolge durch Einhalten einer Diät spiegeln sich in einer Abnahme der IgA-Antikörper gegen die tTG wider. Die große Spezifität zeigt sich in der geringen Extinktion (Hintergrund-Level) der Kontrollseren von Gesunden, Patienten mit Colitis ulcerosa, Leberzirrhose, diversen Tumoren, Sjögrens Syndrom u.v.m. (Abb. 3).

4.6.2. Entwicklung eines ELISA mit Antikörpern anderer Klassen zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Sprue gemäß Anspruch 3 und 4, am Beispiel der IgG-Antikörper

Da ca. 2% der Sprue-Patienten eine IgA-Defizienz besitzen, wurden die Seren auf ihre Sensitivität und Spezifität von IgG-Antikörpern gegen tTG getestet. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 4.5.1. Es wurde lediglich der Peroxidase gekoppelte anti-human IgA Antikörper (Dianova), gegen einen anti-human IgG Antikörper (Dianova) ausgetauscht. Die Werte der Sprue-Patienten entsprachen in ihrer Sensitivität, sowohl vor als auch nach Gluten-freier Diät, in etwa den mit IgA Antikörpern erhaltenen Daten. Kleinere Unterschiede könnten auf eine verzögerte/verlängerte Immunantwort zurückzuführen sein.

Einige Kontrollseren zeigten leicht erhöhte Werte, was früheren Befunden einer verminderten Spezifität der Endomysium-Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz der IgG-Klasse entspricht (Abb. 4).

4.6.3. Entwicklung eines ELISA zur Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen, gemäß Anspruch 5, am Beispiel der IgG-Antikörper

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 4.6.2. beschrieben.

Die Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen oder autoimmunen Erkrankungen (Colitis ulcerosa (C.U.), Morbus Crohn, akute Autoimmunhepatitis) zeigten leicht bis mittelgradig erhöhte Werte. Inwiefern die genetische Veranlagung (Autoimmunhepatiden sind häufig assoziiert mit dem DQ-Allel, welches auch bei der Sprue von Bedeutung ist) zur spezifischen Ausprägung von gegen die tTG gerichteten IgG-Antikörpern verantwortlich ist, muß weiter untersucht werden.

Hier ergibt sich jedoch durch Einsatz z. B. des IgG-spezifischen ELISAs für Autoantikörper gegen die tTG ein neuer Ansatz zur Diagnose und Therapiekontrolle von Patienten mit Erkrankungen, welche mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen.

4.6.4. Klinische Wertigkeit der ELISA-Daten

Der auf der tTG (dem im Patentanspruch 1 aufgeführten Autoantigen der Sprue) basierende neu entwickelte ELISA-Nachweis von IgA-Antikörpern im Serum von Sprue-Patienten eignet sich aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität hervorragend zur Diagnostik und Therapie-Kontrolle der Sprue. Dies wird auch bei der Verlaufs-Kontrolle der behandelten Patienten deutlich

(Titer-Abfall unter Therapie). Ein Vergleich unserer ELISA-Daten mit den Immunfluoreszenz-Auswertungen Dritter (Nachweis von IgA anti-Endomysium) zeigt eine gute Übereinstimmung. Unstimmigkeiten treten vor allem bei niedrigen Antikörper-Titern auf, was jedoch eher zu Lasten der bisher als Goldstandard geltenden indirekten Immunfluoreszenz geht. Dies ist u. a. bedingt durch die subjektive Auswertung und die unspezifischen Begleitreaktionen dieser Methode.

Der entsprechende, auf Antikörpern anderer Klassen beruhende Nachweis, aufgezeigt am Beispiel der IgG-Antikörper, eignet sich zum Auffinden von Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz sowie zur Untersuchung anderer Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen.

Eine weitere Verbesserung erwarten wir durch den Einsatz der aufgereinigten tTG aus Meerschweinchen, der humanen tTG, proteolytisch oder gentechnisch erhaltener immunreaktiver Sequenzen oder Analoga sowie synthetischer immunogener tTG-Peptide im Testsystem.

4.6.5. tTG bzw. von tTG abgeleitete immunogene Peptide als orale Tolerogene zur Erzeugung einer Immuntoleranz (Aktivierung Antigen-spezifischer Suppressorzellen oder Apoptose autoreaktiver T-Zellen) gemäß Anspruch 6 und 7

Die orale Toleranz wird wesentlich durch das Immunsystem des Darmes bestimmt, das eine systemische Immunantwort gegen resorbiertes Antigen verhindert, welches der enzymatischen Verdauung im Darm entging. Neben einer Stimulation der IgA-Sekretion, die eine weitere Aufnahme der Antigene durch die Mukosa verhindern soll, werden insbes. Suppressor-T-Zellen aktiviert, die zur systemischen Toleranz beitragen (47). Orale Toleranz wird zum einen durch die orale Zufuhr des Autoantigens erreicht, zum anderen existiert ein sog. "Bystander-Effekt": sofern das die Krankheit auslösende Autoantigen nicht bekannt ist, kann in einigen Fällen ein anderes Antigen, das im Zielorgan mit dem Immunsystem in Kontakt kommt, zur oralen Therapie verwendet werden. Dieses Antigen ist dann in der Lage, lokal die Antigenspezifischen Suppressor-T-Zellen zu stimulieren und dadurch eine systemische Immunantwort zu unterdrücken (47). Erst bei höherer Antigen-Dosis wird eine Anergie autoreaktiver T-Zellen ausgelöst (48).

Die orale Toleranz wird in letzter Zeit als praktische Behandlungsmethode von diversen Autoimmunerkrankungen gesehen. So sind im Tiermodell bei der experimentellen autoimmunen Thyroiditis (49), der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (50), der Kollagen-induzierten Arthritis (51) und der experimentellen Autoimmun-Uveoretinitis (52) durch orale Zufuhr der entsprechenden Antigene (z. T. aus unterschiedlichen Spezies) Erfolge erzielt worden (53). Es konnte gezeigt werden, daß die einmalige orale Zufuhr einer hohen Antigen-Dosis eine Anergie (funktionelle Inaktivität) autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen bewirkt, während die mehrmalige Gabe kleinerer Dosen die erwünschte aktive Suppression autoreaktiver T-Zellen zur Folge hat (48).

An Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte durch dreimonatige orale Gabe von Kollagen II aus Huhn (0,1 mg im ersten Monat, 0,5 mg in den folgenden 2 Monaten) nach Aussetzen der oralen Antigen-Zufuhr eine zweimonatige nach Absetzen der Therapie anhal-

tende Antigen-spezifische Immunsuppression und damit eine Unterdrückung der Autoimmunerkrankung erreicht werden, was durch eine deutliche Besserung, z. T. sogar ein Abheilen der Erkrankung belegt wurde (54).

Da die tTG, das dem Antrag zugrunde liegende Molekül, das Autoantigen der Sprue darstellt, besteht die Möglichkeit, dieses in seiner Gesamtheit bzw. dessen immunreaktive Epitope (proteolytisch oder gentechnisch hergestellte Sequenzen, Analoga oder synthetische Peptide) zur oralen Therapie einzusetzen. Aufgrund des hohen Homologiegrades zur tTG aus anderen Organismen (z. B. Maus, Meerschweinchen) und der Kreuzreaktivität autoantigener Epitope ist auch eine orale Therapie mit tTG bzw. dessen immunreaktiver Epitope anderer Spezies denkbar.

Aufgrund der erhöhten Immunreaktion anderer Erkrankungen mit der tTG (z. B. andere chronisch entzündliche Darmerkrankungen, autoimmune Hepatiden) ist auch bei diesen Krankheiten ein Einsatz der tTG bzw. deren immunreaktiver Epitope zur oralen Therapie erfolgversprechend.

4.7. Hemmung der tTG und damit der Zell-/Gewebeschädigenden Wirkung des Gliadins und anderer körpereigener und körperfremder Proteine gemäß Anspruch 8

Wie in 4.5. experimentell gezeigt ist, Gliadin ein sehr effektives Substrat für die tTG und besitzt somit die Voraussetzung, mit diversen zellulären und extrazellulären Molekülen quervernetzt zu werden. Dies scheint die Funktion des Gliadins als Gewebe-toxisches, immunogenes Hapten deutlich zu erhöhen. Durch eine Hemmung der tTG könnte eine derart unerwünschte, zur Zellschädigung und Autoimmunreaktion führende Quervernetzung reduziert bzw. vermieden werden.

Eine unphysiologische und schädliche, durch tTG vermittelte Quervernetzung körpereigener Proteine, könnte auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

5. Erreichte Vorteile

Die mit der Erfindung erreichten Vorteile bestehen insbesondere in einem nicht-invasiven, hoch spezifischen, gegen das direkt mit der Erkrankung assoziierte Agens gerichteten Nachweistest für die Sprue und deren Therapie-Kontrolle. Darüberhinaus besteht der große Vorteil des entwickelten Tests in der schnellen, leicht und kostengünstigen Durchführbarkeit und der Standardisierbarkeit zwischen verschiedenen Labors. Der Test ermöglicht dadurch ein effizientes Screening der Bevölkerung auf Antikörper, gerichtet gegen die tTG.

Die Möglichkeit der quantitativen Auswertung der Test-Daten ist zudem durch deren Objektivität gegenüber der subjektiv geprägten Auswertung einer Immunfluoreszenz überlegen. Immunfluoreszenz-Auswertungen werden außerdem, vor allem bei niedrigen Titern, durch unspezifische Begleitreaktionen erschwert. Durch den Einsatz des spezifischen Autoantigens im Testsystem können die bei der Immunfluoreszenz auf Ösophagusmaterial von Primaten bzw. Nabelschnüren unspezifischen Reaktionen weitgehendst ausgeschaltet werden.

Da der Test sowohl auf Antikörper der IgA- als auch anderer Antikörper-Klassen anwendbar ist, werden auch Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz erfaßt. Der auf Antikörpern gegen tTG beruhende Nachweis

eignet sich ebenso zum Auffinden, zur Untersuchung und zur Therapiekontrolle anderer Erkrankungen, die mit einer Immunantwort gegen die tTG einhergehen. Desweiteren besteht durch die Identifizierung der tTG als Autoantigen der Sprue die Möglichkeit, dieses in seiner Gesamtheit bzw. dessen immunreaktive Epitope (proteolytisch oder gentechnisch hergestellte Sequenzen, Analoga oder synthetische Peptide) zur oralen Therapie der Sprue, sowie anderer Erkrankungen, die durch eine Immunantwort gegen die tTG gekennzeichnet sind, einzusetzen.

Ferner erscheint eine (dosierte) Hemmung der tTG-Aktivität attraktiv, um eine Quervernetzung potentiell autoimmuner Haptene (z. B. des Gliadins bei der Sprue) und ihre dadurch erhöhte autoimmune Potenz zu vermindern.

6. Literatur

- 1) Kagnoff, M.F. Celiac Disease. aus Yamada, T. Textbook of Gastroenterology. JB Lippincott Company, Philadelphia 1995; 1643—1661.
- 2) Schreier, K. Maldigestions- und Malabsorptions-synndrome aus pädiatrischer Sicht aus Deming, L. Klinische Gastroenterologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1984; Band 1: 472—514.
- 3) George, E.K., Mearin, M.L., van der Velde, E.A., Houwen, R.H.J., Bouquet, J., Gijsbers, C.F.M., Vandenbroucke, J.P. Low incidence of childhood celiac disease in The Netherlands. *Pediatric Res.* 1995; 37: 213—218.
- 4) Catassi, C., Ratsch, I.-M., Fabiani, E., Rossini, M., Bordicchia, F., Candela, F., Coppa, G.V., Giorgi, P.L. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343: 200—203.
- 5) Marsh, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology* 1992; 102: 330—354.
- 6) Lerner, A., Kumar, V. and Iancu, T.C. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 95: 78—82.
- 7) Ladinsker, B., Rossipal, E., Pittschieler, K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 1994; 35: 776—778.
- 8) Corazza, G., Valentini, R.A., Frisoni, M., Volta, U., Corrao, G., Bianchi, F.B. and Gasbarrini, G. Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients. *Gastroenterology* 1992; 103: 1517—1522.
- 9) Holmes, G.K.T., Prior, P., Lane, M.R., Pope, D. and Allan, R.N. Malignancy in coeliac disease — effect of a gluten free diet. *Gut* 1989; 30: 333—338.
- 10) Schuppan, D., Cantaluppi, M.C., Becker, J., Veit, A., Bunte, T., Troyer, D., Schuppan, F., Schmid, M., Ackermann, R., Hahn, E.G. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 8823—8832.
- 11) Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A.F., Stein, H., Mason, D.Y. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 1984; 32: 219—229.
- 12) Lämmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

- T4. *Nature* 1970; 227: 680—685.
- 13) Heukeshoven, J., Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6: 103—112
- 14) Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 368—379.
- 15) Edman, P.A., and Henschen, A. in: Needleman, S.B.: *Protein Sequence Determination*. Springer Verlag, Berlin. 1975; 232—279.
- 16) Gentile, V., Saydak, M., Chiocca, E.A., Akande, O., Birckbichler, P.J., Lee, K.N., Stein, J.P. and Davies, P.J.A. Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 478—483.
- 17) Blake, M.S., Johnson, K.H., Russel-Jones, G., Gotschlich, E.C. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on western blots. *Anal. Biochem.* 1984; 136: 175—179.
- 18) Folk, J.E. Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 517—531.
- 19) Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. and Rice, R.H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 1991; 5: 3071—3077.
- 20) Ichinose, A., Bottenus, R.E. and Davie, E.W. Structure of transglutaminases. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 13411—13414.
- 21) Gentile, V., Davies, P.J., Baldini, A. The human tissue transglutaminase gene maps on chromosome 20q12 by in situ fluorescence hybridization. *Genomics* 1994; 20: 295—297.
- 22) Gentile, V., Thomazy, V., Piacentini, M., Fesus, L., Davies, P.J.A. Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion. *J. Cell Biol.* 1992; 119: 463—474.
- 23) Upchurch, H.F., Conway, E., Patterson, J.R., M.K., Maxwell, M.D. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J. Cell Physiol.* 1991; 149: 375—382.
- 24) Achyuthan, K.E., Goodell, R.J., Kennedy, J.R., Lee, K.N., Henley, A., Stiefer, J.R., Birckbichler, P.J. Immunochemical analyses of human plasminogen fibrinogen cytosolic transglutaminase interactions. *J. Immunol. Meth.* 1995; 180: 69—79.
- 25) Barsigian, C., Stern, A.M., Martinez, J. Tissue (type II) transglutaminase covalently incorporates itself, fibrinogen, or fibronectin into high molecular weight complexes on the extracellular surface of isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 22501—22509.
- 26) Martinez, J., Chalupowicz, D.G., Roush, R.K., Sheth, A., Barsigian, C. Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers. *Biochemistry.* 1994; 33: 2538—2545.
- 27) Aeschlimann, D., Paulsson, M. Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 15308—15317.
- 28) Bowness, J.M., Folk, J.E., Timpl, R. Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopropetide of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 1022—1024.
- 29) Kleman, J.P., Aeschlimann, D., Paulsson, M., van der Rest, M. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 Rhabdomyosarcoma Cells. *Biochemistry.* 1995; 34: 13768—13775.
- 30) Aeschlimann, D., Kaupp O., Paulsson, M. Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminy substrate. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 881—892.
- 31) Brown-Augsburger, P., Broekelmann, T. Mecham, L., Mercer, R., Gibson, M.A., Cleary, E.G., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., Mecham, R.P. Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 28443—28449.
- 32) Kinsella, M.G., Wight, T.N. Formation of high molecular weight dermatan sulfate proteoglycan in bovine aortic endothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17891—17898.
- 33) Mehul, B., Bawumia, S., Hughes, R.C. Cross-linking of galectin 3, a galactose-binding protein of mammalian cells, by tissue-type transglutaminase. *FEBS Lett.* 1995; 360: 160—164.
- 34) Bowness, J.M., Tarr, A.H., Wong, T. Increased transglutaminase activity during skin wound healing in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988; 967: 234—240.
- 35) Lorand, L., Dailey, J.E., Turner, P.M. Fibronectin as a carrier for the transglutaminase from human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 1057—1059.
- 36) Piacentini, M., Fesus, L., Farrace, M.G., Ghibelli, L., Piredda, L., Melino, G. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur. J. Cell Biol.* 1991; 54: 246—254.
- 37) Piacentini, M. Tissue transglutaminase: a candidate effector element of physiological cell death. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Verlag. 1995; 200: 163—175.
- 38) Fukuda, K., Kojiro, M., Chiu, J.F. Induction of apoptosis by transforming growth factor- β 1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777: a possible association with tissue transglutaminase expression. *Hepatology.* 1993; 18: 945—953.
- 39) Zhang, L.X., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S.J., Jetten, A.M. Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR α -dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6022—6029.
- 40) Suedho W T., Birckbichler, P.J., Lee, K.N., Conway, E., Patterson, Jr. M.K. Differential expression of transglutaminase in human erythroleukemia cells in response to retinoic acid. *Cancer Res.* 1990; 50: 7830—7834.
- 41) Knight, C.R.L., Rees, R.C., Griffin, M. Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1096: 312—318.
- 42) Knight, C.R.L., Rees, R.C., Elliott, B.M., Griffin, M. The existence of an inactive form of transglutaminase within metastasising tumours. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1053: 13—20.
- 43) van Groningen, J.J.M., Klink, S.L., Bloemers, H.P.J., Swart, G.W.M. Expression of tissue-type

transglutaminase, correlates positively with metastatic properties of human melanoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 1995; 60: 383-387.

44) D'Argenio, G., Iovino, P., Cosenza, V., Sorrentini, I., de Ritis, F., delle Cave, M., D'Armiento, F.P., Mazzacca, G. Transglutaminase in azoxymethane-induced colon cancer in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 1995; 40: 685-695.

45) Cordella-Miele, E., Miele, L., Beninati, S., Mukhejee, A.B. Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A₂. *J. Biochem.* 1993; 113: 164-173.

46) Nakaoka, H., Perez, D.M., Baek, K.J., Das, T., Husain, A., Misono, K., Im, M.-J., Graham, R.M. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science.* 1994; 264: 1593-1596.

47) Sieper, J., Mitchison, A.N. Die Therapie mit oralem Kollagen Typ II als neue Möglichkeit der selektiven Immunsuppression in der Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Z. Rheumatol.* 1994; 53: 53-58.

48) Gregerson, D.S., Obritsch, W.F., Donoso, L.A. Oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Immunol.* 1993; 151: 5751-5761.

49) Peterson, K.E., Braley-Mullen, H. Suppression of murine experimental autoimmune thyroiditis by oral administration of porcine thyroglobulin. *Cell. Immunol.* 1995; 166: 123-130.

50) Al-Sabbagh, A., Miller, A., Santos, L.M.B., Weiner, H.L. Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mouse. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 2104-2109.

51) Khare, S.D., Krco, C.J., Griffiths, M.M., Luthra, H.S., David, C.S. Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 1995; 155: 3653-3659.

52) Nussenblatt, R.B., Caspi, R.R., Mahdi, R., Chan, C.-C., Roberge, F., Lider, O., Weiner, H.L. Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J. Immunol.* 1990; 144: 1689-1695.

53) Sosroseno, W. A review of the mechanisms of oral tolerance and immunotherapy. *J. R. Soc. Med.* 1995; 88: 14-17.

54) Trentham, D.E., Dynesius-Trentham, R.A., Orav, E.J., Combitchi, D., Lorenzo, C., Sewell, K.L., Hafler, D.A., Weiner, H.L. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science.* 1993; 261: 1727-1730.

7. Abkürzungen

Abb., Abbildung

AK, Antikörper

APAAP, alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase

BSA, Rinderserumalbumin

cm, Zentimeter

DMEM, Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

EC, Enzymkommission

ELISA, Enzym-linked immunosorbent assay

EZM, Extrazelluläre Matrix

FKS, fötales Kälberserum

h, Stunde(n)

H₂O₂, Wasserstoffperoxid

HLA, humane Lymphozyten-Antigene

IEL, intraepitheliale Lymphozyten

Ig, Immunglobulin

kDa, Kilodalton

M, molar

mA, Milliampere

MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex

min, Minute(n)

mM, millimolar

M_r, reaktive molekulare Masse

µg, Mikrogramm

µl, Mikroliter

PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS, Phosphatpuffer

PLA₂, Phospholipase A₂

PVDF, Polyvinylidendifluorid

s., siehe

SDS, Natriumdodecylsulfat

TCA, Trichloressigsäure

TGF, transformierender Wachstumsfaktor

Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

tTG, Gewebe-Transglutaminase

u. a., unter anderem

z. B., zum Beispiel

z. T., zum Teil

Patentansprüche

1. Gewebe-Transglutaminase (EC 2.3.2.13, tTG) in der Eigenschaft als Autoantigen (immunreaktives körpereigenes Antigen) der einheimischen Sprue/Zöliakie, welches spezifisch durch Antikörper aus Seren von Patienten mit einheimischer Sprue/Zöliakie erkannt wird.

2. Verfahren zur Diagnostik der einheimischen Sprue/Zöliakie, gekennzeichnet durch immunologische Detektion des gemäß Anspruch 1 zugrundeliegenden Autoantigens, dessen immunreaktiver Sequenzen oder Analoga mit Hilfe der IgA-Antikörper der oben angeführten Patienten z. B. in einem ELISA-System.

3. Verfahren zur Diagnostik der einheimischen Sprue v.a. bei Vorliegen einer IgA-Defizienz, gekennzeichnet durch immunologische Detektion des gemäß Anspruch 1 zugrundeliegenden Autoantigens, dessen immunreaktiver Sequenzen oder Analoga mit Antikörpern anderer Klassen der oben angeführten Patienten z. B. in einem ELISA-System.

4. Verfahren zur Verlaufskontrolle bei der Therapie der einheimischen Sprue/Zöliakie gemäß Anspruch 2 und 3.

5. Verfahren zum Nachweis und zur Therapiekontrolle anderer Erkrankungen/Symptome, die mit einer Immunreaktion gegen das Anspruch 1 zugrundeliegende Autoantigen einhergehen, nachgewiesen gemäß Anspruch 2, 3 und 4.

6. Einsatz des gemäß Anspruch 1 zugrundeliegenden Autoantigens, dessen immunreaktiver Sequenzen oder Analoga zur Erzeugung einer oralen Toleranz bei der einheimischen Sprue/Zöliakie oder anderer Erkrankungen/Symptome, die mit einer Immunreaktion gegen das Anspruch 1 zugrundeliegende Autoantigen einhergehen.

7. Erzeugung einer oralen Toleranz gemäß Anspruch 6 für das Anspruch 1 zugrundeliegende Autoantigen, dessen immunreaktiver Sequenzen oder

Analoga durch Stimulation spezifischer Suppressor-Zellen oder durch Induktion einer klinischen Anergie autoreaktiver Immunzellen.

8. Einsatz von Hemmstoffen der tTG, welche eine Quervernetzung des die Krankheit auslösenden Agens (z. B. Gliadin) mit diversen Substraten, die die Immunogenität oder die schädigende Wirkung des auslösenden Agens erhöhen, verhindern.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

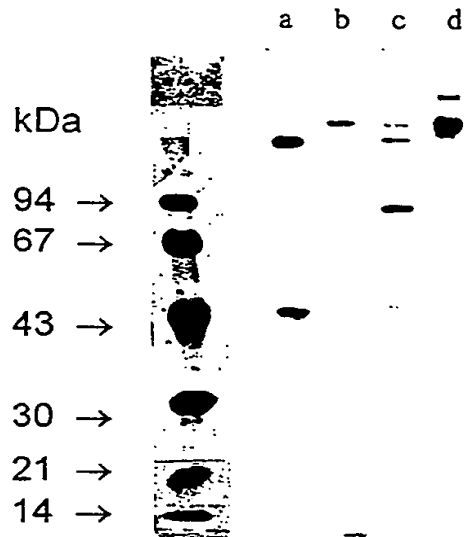
55

60

65

- Leerseite -

Abb. 1: Darstellung des Autoantigens in der SDS-PAGE nach Immunpräzipitation (IP)



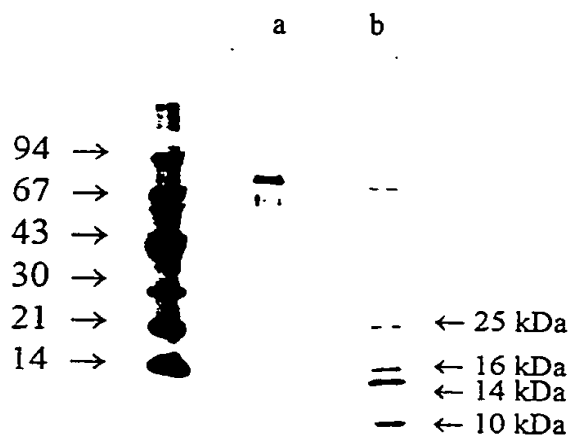
a: IP des Zellysates mit Kontrollserum

b: IP des Mediums mit Kontrollserum

c: IP des Zellysates mit Sprue-Serum, Darstellung des erfindungsgemäßen Autoantigens

d: IP des Mediums mit Sprue-Serum

Abb. 2: Protease-Verdau des Autoantigens mit der Endoprotease Asp-N

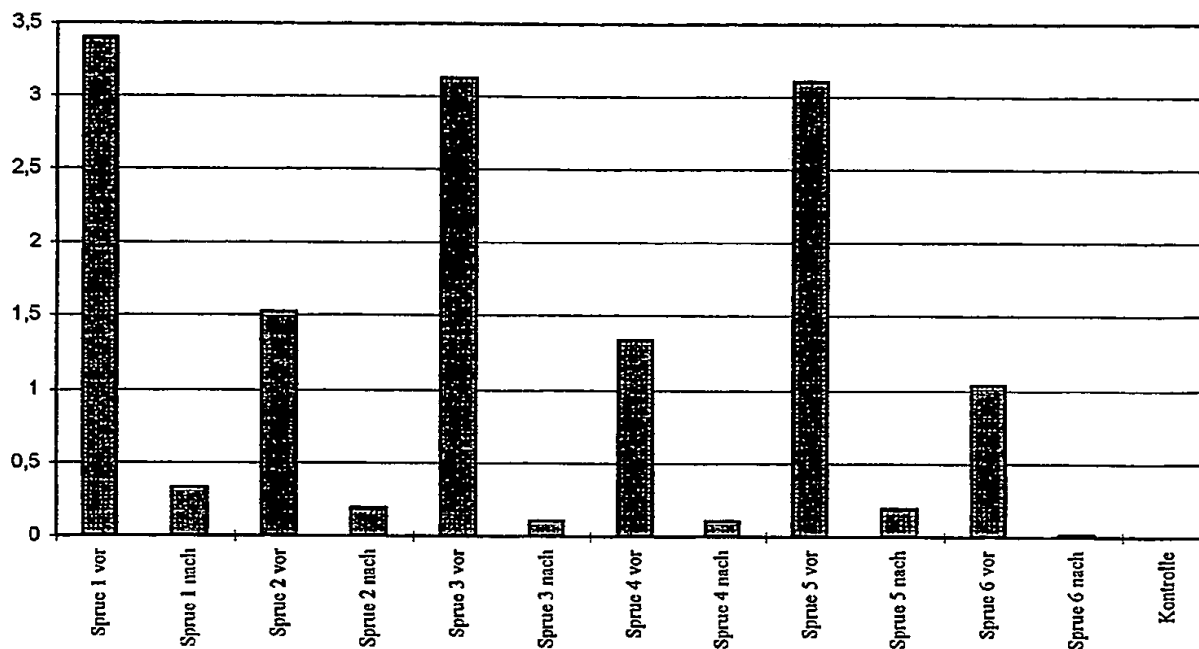


a: erfindungsgemäßes Autoantigen

b: Fragmente des Autoantigens nach Protease-Verdau

Abb. 3:

**IgA-ELISA mit Sprue-Seren vor und nach Gluten-freier Diät
(Serum-Verdünnung 1/400)**



IgA-ELISA mit Kontrollseren (Serum-Verdünnung 1/200)

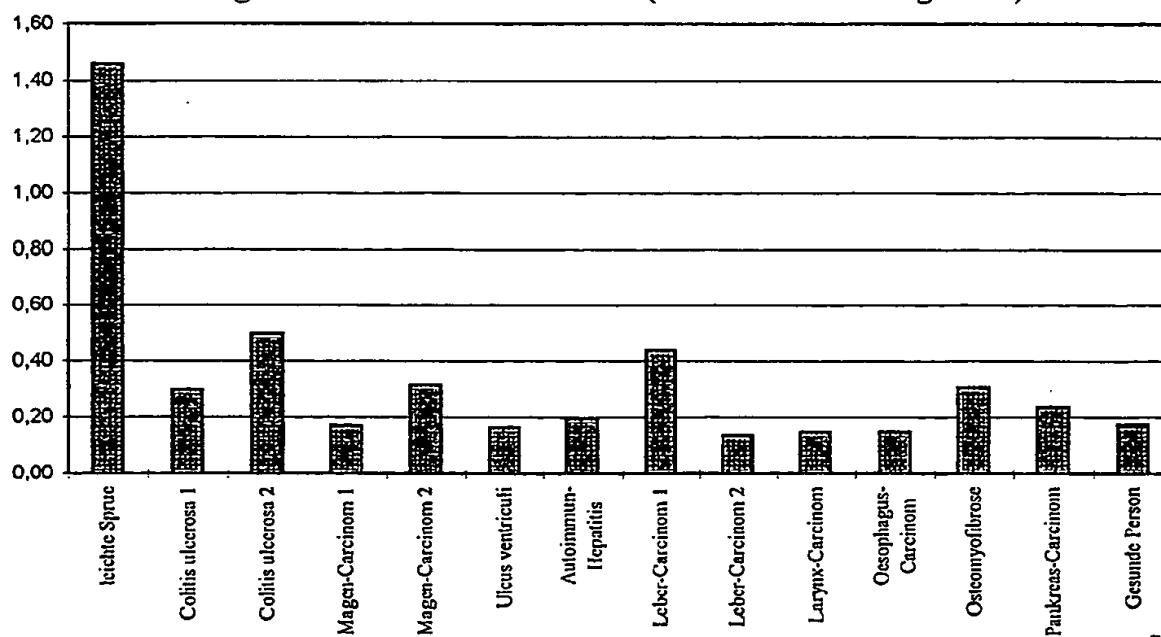


Abb. 4:

